欧洲地熊蜂对我国本土熊蜂的生殖干扰评估

袁晓龙, Muhammad NAEEM, 张　红, 梁　铖, 黄家兴, 安建东*

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室, 北京 100093)

摘要: 【目的】外来物种与本土亲缘关系较近的物种可能会发生交尾竞争,干扰本土物种的正常繁衍。欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* 是全球范围内商业化应用最广的传粉蜂种,但在许多国家造成了生物入侵。本研究旨在明确欧洲地熊蜂对我国本土熊蜂产生生殖干扰的可能性。【方法】采用四级杆飞行时间-气质联用系统(gas chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry, GC-Q-TOF/MS)测定了欧洲地熊蜂和我国本土9种熊蜂的雄蜂头部分泌物的成分,并进行聚类分析;在人工控制环境下比较了欧洲地熊蜂对我国重要熊蜂种类的交尾影响。【结果】雄蜂头部分泌物气质色谱图在同一熊蜂种内基本一致,而在不同熊蜂种之间差异明显;我国红光熊蜂 *B. ignitus*、兰州熊蜂 *B. lantschouensis* 与欧洲地熊蜂的雄蜂头部分泌物成分相似性分别为58.49%与49.23%;在人工控制环境下欧洲地熊蜂雄蜂可以与兰州熊蜂蜂王杂交,并能够显著降低兰州熊蜂的交尾成功率($P<0.01$)。【结论】欧洲地熊蜂与我国一些熊蜂种的雄蜂头部分泌物成分相似性较高,能够干扰其正常交尾,具有较高的生殖干扰风险。为了保护我国本土熊蜂资源与生态系统平衡避免造成生物入侵,我们应该谨慎使用外来熊蜂物种。

关键词: 欧洲地熊蜂; 兰州熊蜂; 雄蜂头部分泌物; 交尾干扰; 生物入侵

中图分类号: Q968　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)03-0348-12

Evaluation of reproductive disturbance to Chinese bumblebees by the European bumblebee, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae)

YUAN Xiao-Long, Muhammad NAEEM, ZHANG Hong, LIANG Cheng, HUANG Jia-Xing, AN Jian-Dong* (Key Laboratory for Insect Pollinator Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: 【Aim】Alien species may interfere with the normal reproduction of the closely related native species through mating competition. Although the European bumblebee, *Bombus terrestris*, is the most widely used pollinator in the world, it has caused biological invasion in many countries. This study aims to elucidate the possibility of reproductive disturbance to some Chinese bumblebees by *B. terrestris*. 【Methods】The components of male cephalic labial gland secretions of *B. terrestris* and nine native bumblebee species in China were detected using gas chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (GC-Q-TOF/MS), and the data were subjected to cluster analysis. The effects of male *B. terrestris* on the mating of the most important native bumblebee species under controlled environment were compared. 【Results】The results showed that the GC-MS chromatograms of male cephalic labial gland secretions were unanimous within a bumblebee species, but significantly different between different bumblebee species. The components of male cephalic labial gland secretions of both *B. lantschouensis* and *B. ignitus* were similar to that of *B. terrestris* with 49.23% and 58.49% identity, respectively. The

基金项目: 国家自然科学基金项目(30672500); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2017-IAR-002)
作者简介: 袁晓龙, 男, 1991年生, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: yuanxiaolong92@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: anjiandong@caas.cn
收稿日期 Received: 2017-07-19; 接受日期 Accepted: 2017-12-22

male of *B. terrestris* could mate with the queen of *B. lantschouensis* and significantly decreased the mating success of the latter ($P < 0.01$). 【Conclusion】It is concluded that the European bumblebee, *B. terrestris*, can interfere with the normal mating and has a high risk of reproductive disturbance to some local bumblebee species of China. In order to protect the local bumblebee resources and ecosystem balance from biological invasion, alien bumblebee species should be cautiously used in China.

Key words: *Bombus terrestris*; *B. lantschouensis*; male cephalic labial gland secretions; mating disturbance; biological invasion

熊蜂是一类重要的传粉昆虫,在维护自然生态系统平衡和农业生产中发挥着十分重要的作用(Williams and Osborne, 2009; An *et al*., 2014)。近20年来,随着全球农业种植结构的调整,设施农业迅猛发展,一些熊蜂种类被人工成功驯养并实现规模化繁育,以满足设施农业授粉需要。欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* 是全球范围内商业化应用最广的传粉蜂种,为设施蔬果传粉带来了巨大的经济效益(Velthuis and van Doorn, 2006)。但是,由于欧洲地熊蜂群势强大、食谱广泛、适应能力强,在使用过程中容易逃出温室在自然界建立野生种群,已经在新西兰、澳大利亚、日本、智利等国造成了生物入侵(Dafni, 1998; Goulson and Hanley, 2004; Hingston, 2005, 2006)。在入侵地区,欧洲地熊蜂不仅与当地蜂种争夺食物资源和营巢场所,还会传播病虫害,其雄蜂甚至会与当地一些种类的蜂王杂交而产生生殖干扰,导致当地野生传粉蜂多样性下降,扰乱了当地的生态系统平衡(Dohzono *et al*., 2008; Inoue, 2008; Ishii *et al*., 2008)。日本的野外调查表明,在不同生态区,小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 蜂王与欧洲地熊蜂雄蜂杂交的比例达到了 20.2% ~30.2%(Kondo *et al*., 2009);同时,实验室条件下也证实了欧洲地熊蜂雄蜂可以和小峰熊蜂蜂王杂交,杂交蜂王产卵率低,且卵无法正常孵化(Kanbe *et al*., 2008)。欧洲地熊蜂和日本本土熊蜂能够产生杂交,有学者认为是因为两种熊蜂的雄蜂头部分泌物存在相似之处(Kanbe *et al*., 2008; Kondo *et al*., 2009)。因此,可以通过研究雄蜂头部分泌物的相似性来判断外来物种对本土熊蜂产生生殖干扰的影响。

雄蜂头部分泌物,也叫雄蜂头唇腺分泌物,是产生于雄蜂头部下唇腺的代谢分泌物,由粗面内质网、光面内质网、高尔基体等细胞器参与合成与分泌,通常包含1种或者几种主要物质和不同数量的微量化合物(Sobotník *et al*., 2008)。雄蜂信息素在熊蜂交尾过程中发挥着重要的作用,在交尾前,雄蜂通常会在一定的范围内进行巡逻式飞行,并将信息素释放到树叶、树枝和草茎等上面标记其飞行路线(Bergman and Bergström, 1997; Žáček *et al*., 2009);这些雄蜂信息素会吸引同种或相似种类的新蜂王,一旦新蜂王进入雄蜂标记的飞行圈,雄蜂就会追上去与之交尾(Schmitt, 1990; O'Neill *et al*., 1991; Ayasse, 2001; Terzo *et al*., 2007; Bertsch *et al*., 2008; Ayasse and Jarau., 2014)。在不同蜂种之间,亲缘关系较近的蜂种其雄蜂信息素比较接近,也能发生杂交的现象(Kanbe *et al*., 2008; Kondo *et al*., 2009)。大部分熊蜂种类,蜂王一生只交尾1次(Payne *et al*., 2003; Takahashi *et al*., 2008; 周志勇, 2016),因此,蜂王交尾至关重要,一旦发生杂交,蜂王就丧失了培育下一代的能力,影响了该蜂种的正常繁衍。

中国是全球熊蜂物种资源最丰富的国家,已知125种,占全球熊蜂种类总数的50%以上(An *et al*., 2014; Williams *et al*., 2017)。近10年来,随着我国设施农业的发展,许多地区都进口欧洲地熊蜂为设施蔬果授粉。虽然未见欧洲地熊蜂入侵中国的报道,但此蜂种对我国本土熊蜂资源的潜在威胁依然存在。为了科学评估欧洲地熊蜂对我国本土熊蜂是否存在潜在的生殖干扰,本研究比较了欧洲地熊蜂和我国几种重要熊蜂的雄蜂头部分泌物,分析了在人工控制环境下欧洲地熊蜂对我国本土熊蜂交尾的影响,旨在为我国本土熊蜂资源保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试蜂种与样品采集

根据中国农业科学院蜜蜂研究所的熊蜂馆藏记录,于2016年7月至10月在我国华北、北疆、青藏高原东部和云贵高原等熊蜂分布较丰富的地区,采集我国有代表性熊蜂种类的雄蜂,主要包括:(1)我国北方地区最丰富的种类火红熊蜂 *B. pyrosoma*;(2)南方地区最丰富的种类短头熊蜂 *B. breviceps*;

(3)已在北疆地区有自然分布的新疆地熊蜂*B. terrestris* XJ;(4)在我国已人工驯养成功的红光熊蜂*B. ignitus*和兰州熊蜂*B. lantschouensis*;(5)其他一些常见种类如关熊蜂*B. consobrinus*、乌苏里熊蜂*B. ussurensis*、红尾熊蜂*B. haemorrhoidalis*等;(6)在我国分布比较丰富的拟熊蜂亚属的代表科尔拟熊蜂*B. coreanus*。欧洲地熊蜂*B. terrestris* EU由荷兰科伯特(北京)农业有限公司购买。

雄蜂的采集和处理参照De Meulemeester等(2011)方法进行。在野外使用网捕法采集雄蜂样本,利用GPS全球定位系统(Garmin 60CS)记录采集点的经纬度和海拔高度。在野外,先根据体色特征进行熊蜂种类的初步鉴定,选择被毛完整,翅脉光滑,处于活跃期的年轻雄蜂,单独置于5 mL离心管中,液氮储存,每头蜂均单独编号。带回实验室后,与欧洲地熊蜂雄蜂一起,用镊子取下雄蜂头部置于2.5 mL萃取瓶中,加入300 μL正己烷浸泡样品,-40℃储存;雄蜂剩余部分仍保留在5 mL离心管中,取每头蜂的前足,进行COI基因测序鉴定确认物种。本研究共涉及9种熊蜂,其中欧洲地熊蜂与新疆地熊蜂因为自然分布区不同,在本实验中作为2个样本组处理;短头熊蜂根据其体色模式不同作为3个样本组处理,因此本实验中熊蜂样本共分为12组,其中中国本土熊蜂共为11组(表1)。

表1 本研究中熊蜂雄蜂样本信息

Table 1 Samples of male bumblebees in this study

种类 Species	个体数量 Number of individuals	采集地点 Collection site	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔(m) Altitude
关熊蜂 *Bombus consobrinus*	10	河北承德 Chengde, Hebei	40.5989°N	117.4796°E	2 076
科尔拟熊蜂 *Bombus coreanus*	7	河北承德 Chengde, Hebei	40.5910°N	117.4928°E	1 825
火红熊蜂 *Bombus pyrosoma*	10	河北承德 Chengde, Hebei	40.5230°N	117.6597°E	756
红光熊蜂 *Bombus ignitus*	10	河北承德 Chengde, Hebei	40.5230°N	117.6597°E	756
乌苏里熊蜂 *Bombus ussurensis*	7	河北承德 Chengde, Hebei	41.4971°N	117.6597°E	675
新疆地熊蜂 *Bombus terrestris* XJ	20	新疆塔城 Tacheng, Xinjiang	46.5176°N	83.6130°E	516
兰州熊蜂 *Bombus lantschouensis*	7	甘肃永登 Yongdeng, Gansu	36.6921°N	102.7370°E	2 204
昆明短头熊蜂 *Bombus breviceps* KM	7	云南昆明 Kunming, Yunnan	24.8439°N	102.8422°E	1 938
个旧短头熊蜂 *Bombus breviceps* GJ	7	云南个旧 Gejiu, Yunnan	23.4006°N	103.0705°E	2 205
屏边短头熊蜂 *Bombus breviceps* PB	7	云南屏边 Pingbian, Yunnan	23.0116°N	103.6404°E	1 058
红尾熊蜂 *Bombus haemorrhoidalis*	7	云南屏边 Pingbian, Yunnan	23.0116°N	103.6405°E	1 058
欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* EU	25	-	-	-	-

Bombus terrestris XJ: 新疆地熊蜂*Bombus terrestris* collected from Xinjiang; *Bombus terrestris* EU: 欧洲地熊蜂*Bombus terrestris* imported from Europe by Koppert; *Bombus breviceps* KM, *Bombus breviceps* GJ, *Bombus breviceps* PB: 短头熊蜂*Bombus breviceps*的3个体色模式 Different color patterns of *Bombus breviceps*. 下同 The same below.

1.2 雄蜂头部分泌物萃取与气质分析

参照前人对熊蜂雄蜂头部分泌物的萃取方法(De Meulemeester *et al*., 2011; Brasero *et al*., 2015; Lecocq *et al*., 2015b),将装有正己烷和雄蜂头部的2.5 mL萃取瓶从40℃的冰箱取出,统一放在20℃恒温箱中静止萃取24 h。然后从每个萃取瓶中移取200 μL萃取液至2.5 mL进样瓶的内衬管里,且一一对应做好标记,采用7200 Accurate-Mass的GC-Q-TOF/MS(四级杆飞行时间-气质联用系统,安捷伦科技有限公司)进行分析。参考De Meulemeester等(2011)的方法,气相色谱与质谱联用仪参数设置为:色谱柱:DB-5MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm;进样量:1 μL;载气:氦气,不分流模式,流速为1 mL/min;进样温度:250℃;传输线温度:250℃;程序升温如下:初始温度55℃(保持2 min),升温速度为10℃/min,最终温度达到300℃(保持2 min);离子化模式:EI,电子能量为70 eV;电离源温度200℃;四级杆温度:150℃;扫描方式:全扫描,质荷比(*m*/*z*)范围40~600。

1.3 人工控制环境下的交尾试验

参照周志勇(2016)的方法,组织欧洲地熊蜂和兰州熊蜂的交尾试验,其中兰州熊蜂来自中国农业科学院蜜蜂研究所熊蜂饲养室。熊蜂正常交尾实验中兰州熊蜂蜂王与雄蜂比例为1:8,且不加入欧洲

地熊蜂。为比较欧洲地熊蜂雄蜂对兰州熊蜂交尾的影响,本研究在兰州熊蜂正常交尾对照组的基础上,分别加入与兰州熊蜂雄蜂数量比例为 1∶4, 1∶2和1∶1的欧洲地熊蜂雄蜂,包括对照组在内共设置 4 种交尾处理组。分别置于 4 个交尾网室中进行交尾,每次交尾各处理组的兰州熊蜂蜂王数量均在 10 头以上。统计各处理组中实验开始 2 h 内、兰州熊蜂蜂王分别与兰州熊蜂雄蜂和欧洲地熊蜂雄蜂交尾的数量,同时记录交尾时间。在整个熊蜂交尾季节,共组织 3 次交尾重复实验,每个交尾梯度分别使用 40 头兰州熊蜂蜂王(表 2)。

表 2　欧洲地熊蜂雄蜂和兰州熊蜂雄蜂竞争交尾实验中所用个体数

Table 2　Number of individuals in competitive mating of male *Bombus terrestris* with *Bombus lantschouensis*

交尾批次 Mating batches	交尾梯度 Mating gradient	兰州熊蜂蜂王数 Number of queen *B. lantschouensis*	兰州熊蜂雄蜂数 Number of male *B. lantschouensis*	欧洲地熊蜂雄蜂数 Number of male *B. terrestris*
1	1 (CK)	11	88	0
	2	12	96	24
	3	12	96	48
	4	11	88	88
2	1 (CK)	14	112	0
	2	14	112	56
	3	14	112	56
	4	15	120	120
3	1 (CK)	15	120	0
	2	14	112	28
	3	14	112	56
	4	14	112	112

CK：兰州熊蜂正常交尾实验,蜂王与雄蜂比例为 1∶8,且不加入欧洲地熊蜂雄蜂 The normal mating of *B. lantschouensis* with the ratio of queens to males of 1∶8, without male *B. terrestris* added. 图 7 同 The same for Fig. 7.

1.4　数据统计与分析

采用 Agilent Technologies Mass Profiler Professional(MPP,版本 2.1.5)分析软件对雄蜂头部分泌物数据进行主成分聚类分析(principal component analysis, PCA)。数据导入 MPP 后首先将参数对齐,之后参考 De Meulemeester 等(2011)的方法,对 12 组雄蜂头部分泌物气质数据进行优化处理,每个样本的气质数据进行面积归一化,剔除相对峰面积小于 0.1% 的峰,过滤掉每组样本中出现频率低于 50% 的峰,将每组所有样本的头部分泌物气质数据进行均一化。通过搜索数据库(National Institute of Standards and Technology, NIST 14)进行雄蜂头部分泌物特征化合物的鉴定。4×2 卡方检验(*Chi*-square test)分析交尾成功率差异,一般线性模型(general linear model, GLM)分析不同组合的熊蜂交配时间差异,分析软件为 Statistics Analysis System(SAS 9.2)。

2　结果

2.1　雄蜂头部分泌物典型气相色谱质谱图

12 组样本 GC-Q-TOF/MS 气质色谱图的出峰时间范围为 14 ~ 30 min,所以,我们以 14 ~ 30 min 保留时间为横坐标、峰高百分数为纵坐标,比较了 12 组样本雄蜂头部分泌物的典型气质色谱图。

欧洲地熊蜂和新疆地熊蜂尽管分布区不同,但 2 个样本的峰型图基本一致(图 1);同样,尽管来自云南屏边、云南昆明和云南个旧的短头熊蜂体色模式不同,但 3 个样本的峰型图也基本一致(图 2);说明在同一蜂种内,雄蜂头部分泌物的气质色谱图保持高度一致。相反,在不同蜂种之间,雄蜂头部分泌物的气质色谱图差异明显。从出峰时间和峰高来看,我国本土的红光熊蜂、兰州熊蜂与欧洲地熊蜂相似度最高,红尾熊蜂次之,短头熊蜂、关熊蜂、火红熊蜂、科尔拟熊蜂、乌苏里熊蜂相差较远(图 3)。

2.2　雄蜂头部分泌物聚类分析

雄蜂头部分泌物气质数据经优化和均一化处理后,12 组样本共发现特征化合物 137 个,其中欧洲地熊蜂 48 个、新疆地熊蜂 56 个、红光熊蜂 53 个、兰州熊蜂 65 个、红尾熊蜂 57 个、短头熊蜂屏边/昆明/个旧分别是 43/43/48 个、关熊蜂 55 个、火红熊蜂 39 个、乌苏里熊蜂 48 个、科尔拟熊蜂 51 个。采用 Agilent Technologies Mass Profiler Professional(MPP, 版本 2.1.5)分析软件根据雄蜂头部分泌物的相似性对 12 组样本进行聚类,结果显示,欧洲地熊蜂与我国新疆地熊蜂、红光熊蜂、兰州熊蜂的关系最近,与红尾熊蜂的关系次之,与短头熊蜂、关熊蜂、火红熊蜂、乌苏里熊蜂和科尔拟熊蜂的关系较远(图 4)。

每一种熊蜂的雄蜂头部分泌物都包含多种化学物质,在化学物质种类上欧洲地熊蜂与我国新疆地熊蜂的重叠率最高,为 64.29%,与我国本土红光熊蜂、兰州熊蜂的重叠率也很高,分别为 58.49% 和 49.23%(图 5)。

2.3　雄蜂头部分泌物鉴定结果

将 12 组样本中发现的 137 个特征化合物,统一导入软件 MPP 后,通过搜索数据库 NIST 14 对特征物进行物质鉴定。在特征化合物鉴定上,定义数据库中化合物与特征化合物匹配分数大于80的为可

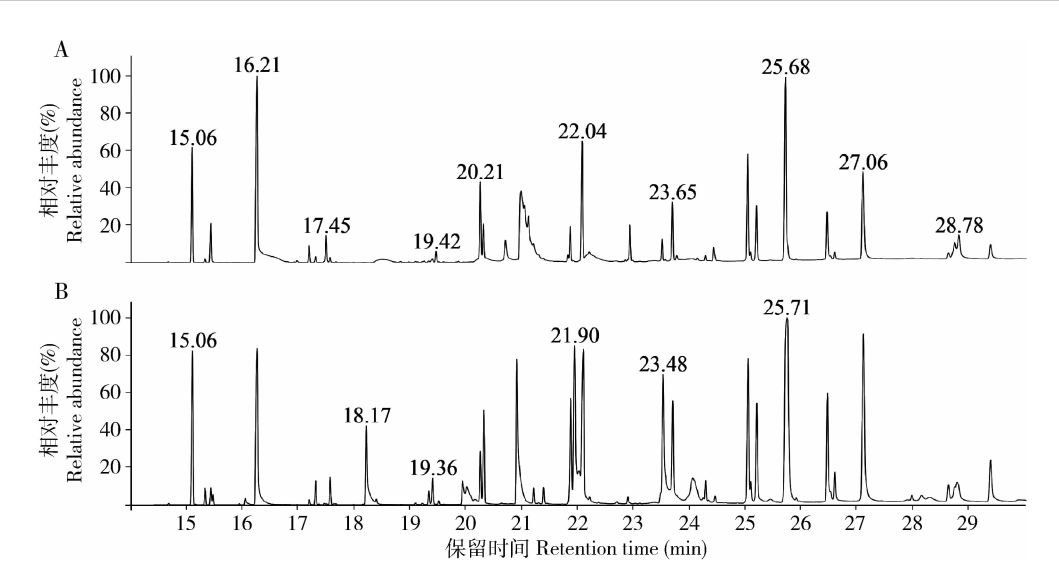


图 1　欧洲地熊蜂与新疆地熊蜂雄蜂头部分泌物典型气质色谱图

Fig. 1　Typical GC-MS chromatograms for the male cephalic labial gland secretions of *Bombus terrestris* EU and *Bombus terrestris* XJ

A：新疆地熊蜂 *Bombus terrestris* XJ；B：欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* EU. 各个化学物质离子峰及出峰时间已标注。图 2 和 3 同。The ion peaks and time of the main chemicals were presented. The same for Figs. 2 and 3.

图 2　3 种体色模式的短头熊蜂雄蜂头部分泌物典型气质色谱图

Fig. 2　Typical GC-MS chromatograms for the male cephalic labial gland secretions of *Bombus breviceps* with three color patterns

A：屏边短头熊蜂 *Bombus breviceps* PB；B：昆明短头熊蜂 *Bombus breviceps* KM；C：个旧短头熊蜂 *Bombus breviceps* GJ.

信匹配结果。本实验 137 个特征化合物中只有 15 个给出了匹配分数大于 80 的化合物名称，包含烯炔醇类 8 种，有 9，12-十八碳二烯-1-醇（9，12-octadecadien-1-ol）、1-十六烷醇（1-hexadecanol）、9，12，15-十八碳三烯-1-醇（9，12，15-octadecatrien-1-ol）等；酸酯类 3 种，分别是环己烷丁酸（cyclohexanebutanoic

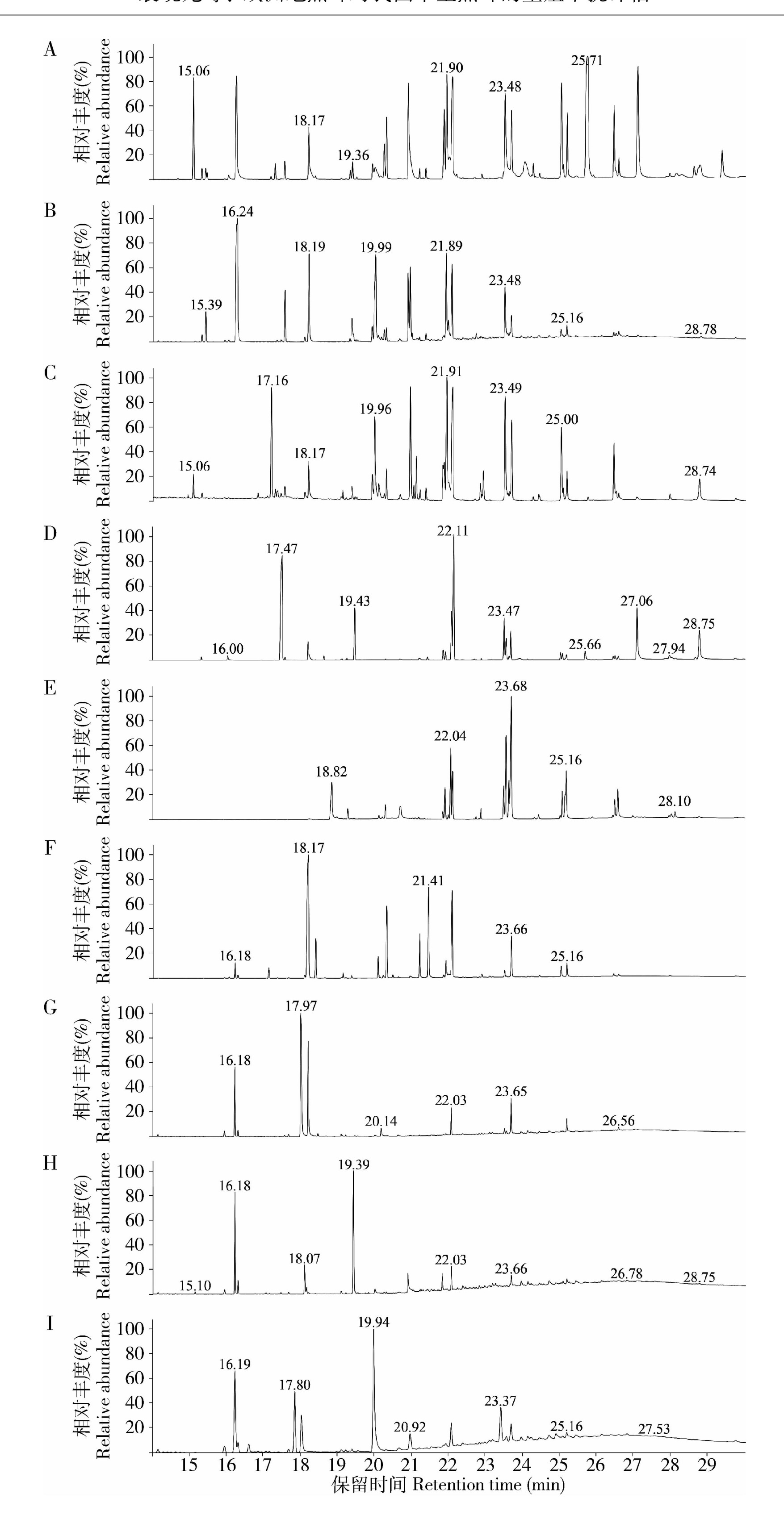


图 3　9 种熊蜂雄蜂头部分泌物典型样本气质色谱图

Fig. 3　Typical GC-MS chromatograms for the male cephalic labial gland secretions of nine bumblebee species

A：欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* EU；B：红光熊蜂 *Bombus ignitus*；C：兰州熊蜂 *Bombus lantschouensisi*；D：红尾熊蜂 *Bombus haemorrhoidalis*；E：短头熊蜂 *Bombus breviceps*；F：关熊蜂 *Bombus consobrinus*；G：火红熊蜂 *Bombus pyrosoma*；H：科尔拟熊蜂 *Bombus coreanus*；I：乌苏里熊蜂 *Bombus ussurensis*.

红尾熊蜂
Bombus haemorrhoidalis
欧洲地熊蜂
Bombus terrestris EU
新疆地熊蜂
Bombus terrestris XJ
红光熊蜂
Bombus ignitus
兰州熊蜂
Bombus lantschouensis
个旧短头熊蜂
Bombus breviceps GJ
昆明短头熊蜂
Bombus breviceps KM
屏边短头熊蜂
Bombus breviceps PB
关熊蜂
Bombus consobrinus
火红熊蜂
Bombus pyrosoma
科尔拟熊蜂
Bombus coreanus
乌苏里熊蜂
Bombus ussurensis

图 4　12 组样本熊蜂雄蜂头部分泌物的特征化合物聚类树状图

Fig. 4　Clustering tree of the male cephalic labial gland secretions of 12 bumblebee samples

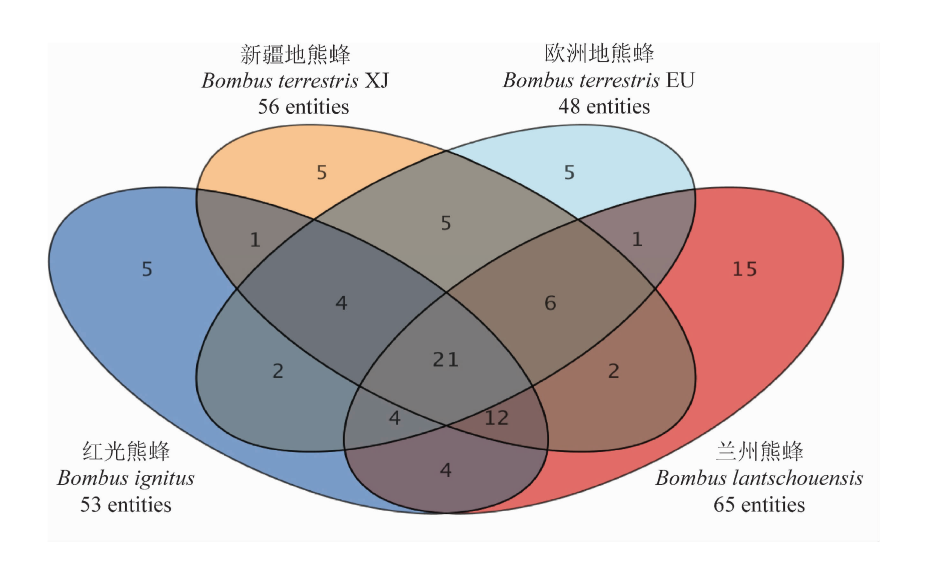


图 5　相似度较高的 4 组样本熊蜂雄蜂头部分泌物特征化合物重叠情况

Fig. 5　Overlap of the male cephalic labial gland secretions of the four closely related bumblebee samples

图中数字代表雄蜂头部分泌物的特征化合物种类数。The numbers in the figure represent the number of compounds in the male cephalic labial gland secretions of bumblebee species.

acid）、2-碘-5-甲基-4-氧杂三环［4.2.1.0（3,7）］壬烷-6-羧酸（2-iodo-5-methyl-4-oxa tricyclo［4.2.1.0（3,7）］nonane-6-carboxylic acid）和十六醇乙酸酯（1-hexadecanol acetate）；烷类2种，分别为1-壬基环庚烷（1-nonyl cycloheptane）和1,2,3,4,5,6-六甲基环己烷（1,2,3,4,5,6-hexamethyl cyclohexane）；醛类2种，分别为13-十八碳烯醛（13-octadecenal）和9-十八碳烯醛（9-octadecenal）。这15种特征化合物在不同熊蜂种的分布如表3所示。剩余特征物只有相对分子量，没有获得匹配分数大于80的化合物名称。

2.4　欧洲地熊蜂对兰州熊蜂交尾的影响

在实验条件下，不受欧洲地熊蜂影响，兰州熊蜂蜂王的交尾成功率为67.5%。在交尾笼内放入欧洲地熊蜂雄蜂后，发现欧洲地熊蜂雄蜂和兰州熊蜂蜂王可以杂交（图6）；而且，随着交尾笼中欧洲地熊蜂雄蜂数量的增加，兰州熊蜂种内交尾成功率显著下降（$\chi^2=26.3620$, $P<0.01$）（图7）。说明欧洲地熊蜂对兰州熊蜂存在交尾竞争，能够显著影响兰州熊蜂的种内交尾。



图6　欧洲地熊蜂雄蜂与兰州熊蜂蜂王杂交

Fig. 6　Hybrid mating of a *Bombus terrestris* male with a *B. lantschouensis* queen

2.5　欧洲地熊蜂、兰州熊蜂种内交尾以及2种熊蜂杂交的时间

用GLM模型分析了欧洲地熊蜂、兰州熊蜂、欧洲地熊蜂雄蜂和兰州熊蜂蜂王杂交的交尾时间差异。首先，Levene检验显示不同处理的交尾时间数据具备方差齐性，不同组间的方差相等（$P=0.537$）；之后GLM模型分析显示不同熊蜂组合交尾时间差异显著（$F_{2,37}=13.125$, $P<0.001$）；最后，最小显著极差法（LSD）多重比较表明，欧洲地熊蜂的平均交尾时间为25.35 min，极显著高于兰州熊蜂的平均交尾时间17.40 min，也极显著高于欧洲地熊蜂雄蜂与兰州熊蜂蜂王的杂交时间20 min；而后两组的交尾时间无显著差异（图8）。

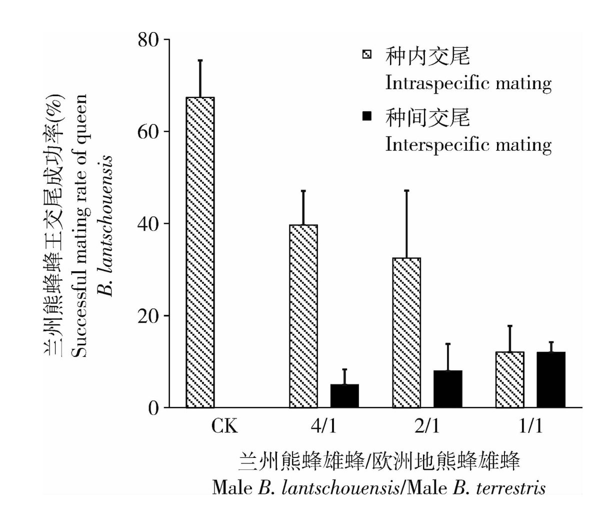


图7　欧洲地熊蜂雄蜂对兰州熊蜂交尾的影响

Fig. 7　Effect of male *Bombus terrestris* on mating of *Bombus lantschouensis*

图中数值为平均值±标准差（$\chi^2=26.3620$, $P<0.01$，卡方检验）。Data in the table are mean ± *SD* ($\chi^2=26.3620$, $P<0.01$, *Chi*-square test).

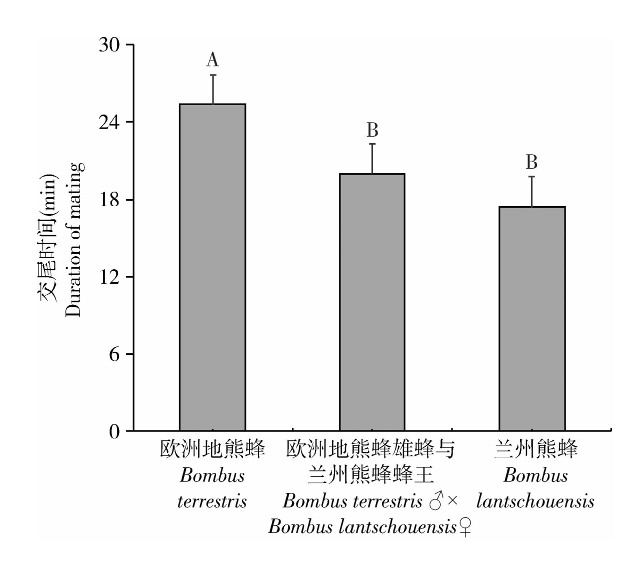


图8　欧洲地熊蜂和兰州熊蜂种内交尾和种间交尾的时间

Fig. 8　Duration of intraspecific mating and interspecific mating in *Bombus terrestric* and *B. lantschouensis*

图中数值为平均值±标准差；柱上不同字母表示经最小显著极差法（LSD）多重比较在$P<0.01$水平上差异显著。Data in the table are mean ± *SD*. Different letters above bars mean significant difference at the 0.01 level by multiple comparison by least significant difference.

表 3 鉴定出的雄蜂头部分泌物特征化合物在熊蜂样本中的分布

Table 3 Distribution of identified compounds of male cephalic labial gland secretions in bumblebee samples

保留时间 Retention time (min)	化合物 Compounds	样本中分布情况 Distribution in samples									
		欧洲地熊蜂 *B. terrestris* EU	新疆地熊蜂 *B. terrestris* XJ	红光熊蜂 *B. ignitus*	兰州熊蜂 *B. lantschouensis*	短头熊蜂 *B. breviceps*	火红熊蜂 *B. pyrosoma*	红尾熊蜂 *B. haemorrhoidalis*	乌苏里熊蜂 *B. ussurensis*	关熊蜂 *B. consobrinus*	科尔拟熊蜂 *B. coreanus*
15.05	环己烷丁酸 Cyclohexanebutanoic acid		√		√						
15.29	9,12-十八碳二烯-1-醇 9,12-Octadecadien-1-ol	√	√	√		√		√			
15.36	橙花叔醇 Nerolidol	√	√								
15.60	1,2,3,4,5,6-六甲基环己烷 1,2,3,4,5,6-Hexamethyl cyclohexane				√						
16.25	2-碘-5-甲基-4-氧杂三环[4.2.1.0(3,7)]壬烷-6-羧酸 2-Iodo-5-methyl-4-oxatricyclo[4.2.1.0(3,7)]nonane-6-carboxylic acid	√	√	√							
17.49	13-十八碳烯醛 13-Octadecenal	√	√	√	√	√	√	√			√
17.52	1-壬基环庚烷 1-Nonyl cycloheptane		√		√			√			
17.53	1-十八炔 1-Octadecyne		√	√	√		√	√			
19.26	9,12,15-十八碳三烯-1-醇 9,12,15-Octadecatrien-1-ol	√									
19.41	十六醇乙酸酯 1-Hexadecanol Acetate		√	√	√			√	√		√
21.38	3,13-十八碳二烯-1-醇 3,13-Octadecadien-1-ol				√			√		√	
21.91	1-十六烷醇 1-Hexadecanol	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
24.86	9-十八碳烯醛 9-Octadecenal								√		
25.12	10-二十一碳烯 10-Heneicosene		√	√	√	√	√	√	√	√	√
29.35	角鲨烯 Squalene	√	√								

勾号表示这一熊蜂种雄蜂头部分泌物中含有该化合物,空白表示不含有。The tick indicates presence of the compound in the male cephalic labial gland secretions of this sample, while the blank indicates absence of the compound.

3 讨论

3.1 雄蜂头部分泌物的种间特异性和系统发育关系

雄蜂头部分泌物具有物种特异性，这一特性被很多学者用作熊蜂分类的重要依据（Bertsch *et al.*, 2005；Rasmont *et al.*, 2005；Terzo *et al.*, 2005；Coppée *et al.*, 2011；Bertsch and Schweer, 2012；Lecocq *et al.*, 2015b）。本研究结果也表明，雄蜂头部分泌物在同一蜂种不同生态型之间差异不大。尽管欧洲地熊蜂和新疆地熊蜂的生态区明显不同，但其雄蜂头部分泌物的色谱图基本一致，雄蜂头部分泌物特征化合物也聚在一个分支上。个旧短头熊蜂、昆明短头熊蜂和屏边短头熊蜂的体色模式明显不同，同样，其头部分泌物特征化合物也聚在一起，这与 Hines 和 Williams（2012）利用 5 个基因研究短头熊蜂体色模式多态性的结果一致。而在不同熊蜂种之间，雄蜂头部分泌物差异明显，且这种差异能够反映不同蜂种的亲缘关系，即地熊蜂的雄蜂头部分泌物和来自同一亚属真熊蜂亚属的红光熊蜂和兰州熊蜂比较接近，和其他蜂种的关系较远。这一结果也与该类群的系统发育关系相吻合（Williams *et al.*, 2012）。欧洲地熊蜂与新疆地熊蜂为同种，兰州熊蜂、红光熊蜂和地熊蜂均属于真熊蜂亚属，而其他熊蜂种类则属于其他熊蜂亚属。从系统发育的角度来讲，亲缘关系越近的蜂种发生杂交的可能性越大。

Žáček 等（2009）研究表明，欧洲地熊蜂雄性吸引蜂王的信息素为 2，3-二氢金合欢醇（2，3-dihydrofarnesol）、2，3-二氢金合欢（2，3-dihydrofarnesal）、香叶基香茅醇（geranylcitronellol）、十二酸乙酯（ethyl dodecanoate）、1-十六烷醇（hexadecan-1-ol）和 9，12，15-十八碳三烯-1-醇（octadeca-9，12，15-trien-1-ol）6 种物质，其中 1-十六烷醇与 9，12，15-十八碳三烯-1-醇 2 种物质还吸引同亚属的明亮熊蜂 *B. lucorum* 蜂王。本研究 12 组样本共发现雄蜂头部分泌物特征化合物 137 个，其中只鉴定了 15 种，其他绝大部分并没有鉴定出来。这 15 种化合物中包含欧洲地熊蜂已知 6 种信息素的 2 种，其中，9，12，15-十八碳三烯-1-醇只在欧洲地熊蜂样本中发现，1-十六烷醇则存在于除科尔拟熊蜂之外的所有样本组中。本实验鉴定的 9，12-十八碳二烯-1-醇，这一个化合物是明亮熊蜂的雄蜂信息素，本次在多种熊蜂中发现，再次表明不同熊蜂种之间有相同的雄蜂信息素。其他绝大部分并没有鉴定出来。这一问题可能与特征化合物的提取鉴定方法有关，我们采取的是更为精确的 Profinder 提取方法，即将所有样本的气质数据参数对齐之后再做统一特征化合物提取，提取鉴定之后再次带入原数据进行验证。而另一种提取方法是 Unknown 模式，这一模式是直接从气质数据中提取特征化合物进行鉴定。这种方法精确性较差。即便是 Profinder 法，其鉴定结果也仅仅是参考结果，需要人工合成标准物比对才可以确定准确的化合物。所以，对于某一特定蜂种，真正对蜂王产生吸引作用的雄蜂头部分泌物化合物组分还有待进一步的鉴定与验证，雄蜂信息素吸引同种或近缘种蜂王的作用机制也有待深入的研究。

本研究参考了前人对熊蜂雄性头部分泌物气质数据的处理方法（Bertsch *et al.*, 2008；De Meulemeester *et al.*, 2011；Lecocq *et al.*, 2015b），通过剔除相对峰面积小于 0.1% 的峰和出现频率低于 50% 的峰来减小色谱柱中残留物、脱落物和样品污染带来的实验误差，保证气质数据的可靠性。

3.2 欧洲地熊蜂对本地熊蜂交尾的影响

兰州熊蜂是我国近几年筛选出来的本土良种熊蜂，人工繁育效率高，传粉性能优良，是我国极具商业化潜力的传粉蜂种（安建东等, 2010；Williams *et al.*, 2012；周志勇等, 2015）。本研究结果显示兰州熊蜂雄蜂头部分泌物中有 49.23% 的化合物组分和欧洲地熊蜂雄蜂头部分泌物重叠。尽管现在还不清楚兰州熊蜂雄性头部分泌物中是哪一种或者哪几种物质吸引了兰州熊蜂蜂王，但是我们推测地熊蜂雄性头部分泌物中应该有吸引兰州熊蜂蜂王的物质。有报道称欧洲地熊蜂蜂王对来自同一生态区的同种雄蜂信息素更加敏感，认为和其他熊蜂竞争交尾的可能性不大（Lecocq *et al.*, 2015a）。但是欧洲地熊蜂入侵日本的事实已经推翻这一结论，因为蜂王受精囊的精子检测结果表明，欧洲地熊蜂雄蜂和日本小峰熊蜂蜂王杂交的比例高达 20% ~30%（Kondo *et al.*, 2009）。本研究结果表明欧洲地熊蜂雄蜂不仅能和兰州熊蜂蜂王杂交，最主要的影响是干扰兰州熊蜂正常交尾，使得兰州熊蜂交尾成功率大幅降低。所以我们推测欧洲地熊蜂在日本造成的生物入侵应该比报道的更为严重，可能有更多的本土蜂王没有成功交尾，最终导致无法滞育越冬而死亡。

交尾时间和蜂种有关，不同蜂种的交尾时间可能不同，兰州熊蜂的交尾时间小于新疆地熊蜂的交尾时间（周志勇, 2016）。本研究结果也验证了这一个现象，欧洲地熊蜂的交尾时间显著长于兰州熊蜂，

也显著长于欧洲地熊蜂雄蜂和兰州熊蜂蜂王杂交的时间。从交尾时间上看,欧洲地熊蜂雄蜂和兰州熊蜂蜂王的杂交是有效的交尾。通过比较交尾时间,我们推测,熊蜂交尾时间,不仅与雄蜂有关,可能更加取决于蜂王本身。虽然目前我们没有进一步研究杂交蜂王滞育后的产卵以及孵化情况,但是无论能否产卵孵化,杂交本身就已经干扰了本土熊蜂的正常繁衍。

3.3 小结与建议

近几年来,欧洲地熊蜂在中国多个地区推广使用,应用数量逐年上升。虽然未见欧洲地熊蜂入侵中国的报道,但是我们应该高度重视。欧洲地熊蜂一旦在我国自然界建立野生种群,其扩散速度和数量可能难以控制,可能会和本土熊蜂竞争营巢场所和食物资源,也可能会传播新的病虫害,严重威胁本土熊蜂资源的生态安全。预防比控制暴发更经济也更有效,无论是消除外来熊蜂带来的生物入侵风险,还是充分利用我国的授粉市场,立足开发本土熊蜂资源无疑是最佳选择。这也是北美地区、日本、韩国等众多国家采取的政策(MacFarlane *et al*., 1994; Asada and One, 2000; Mah *et al*., 2001; Cnaani *et al*., 2002; Yong *et al*., 2007)。最近几年,英国、美国、法国等农业发达国家相继出台了保护本土传粉昆虫的国家发展战略,旨在为维护地区生态系统平衡和食物安全生产提供保障。我国是全球设施园艺生产第一大国,设施蔬果授粉市场十分巨大。同时,中国也是全球熊蜂资源最丰富的国家,我们应该充分发挥本土熊蜂资源的优势、加强应用基础研究,深度解析兰州熊蜂、密林熊蜂等良种熊蜂的发育生物学特性,攻克熊蜂规模化繁育关键技术难题,实现熊蜂授粉技术国产化,服务我国现代农业生产,保护本土传粉昆虫资源。在此之前应该加强对进口熊蜂的管理,并对购买进口熊蜂的企业和农户进行培训,使之在使用过程中避免熊蜂外逃至自然界,特别是蜂王,使用后应及时处理。

致谢 本实验样品的 GC-Q-TOF/MS 分析在中国农业科学院生物技术研究所实验中心进行;安捷伦科技有限公司杜伟工程师在数据分析方面给予大力帮助;中国农业科学院蜜蜂研究所薛晓峰博士、代平礼博士审阅论文并提出修改建议,在此一并表示感谢。

参考文献(References)

An J, Huang J, Shao Y, Zhang S, Wang B, Liu X, Wu J, Williams PH, 2014. The bumblebees of North China (Apidae, *Bombus* Latreille). *Zootaxa*, 3830(1): 1-89.

An JD, Huang JX, Williams PH, Wu J, Zhou BF, 2010. Species diversity and colony characteristics of bumblebees in the Hebei region of North China. *J. Appl. Ecol*., 21(6): 1542-1550. [安建东, 黄家兴, Williams PH, 吴杰, 周冰峰, 2010. 河北地区熊蜂物种多样性与蜂群繁育特性. 应用生态学报, 21(6): 1542-1550]

Asada S, Ono M, 2000. Difference in colony development of two Japanese bumblebees, *Bombus hypocrita* and *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Appl. Entomol. Zool*., 35(4): 597-603.

Ayasse M, Paxton RJ, Tengo J, 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol*., 46(1): 31-78.

Ayasse M, Jarau S, 2014. Chemical ecology of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol*., 59(1): 299-319.

Bergman P, Bergström G, 1997. Scent marking, scent origin, and species specificity in male premating behavior of two Scandinavian bumble bees. *J. Chem. Ecol*., 23(5): 1235-1251.

Bertsch A, Schweer H, 2012. Male labial gland secretions as species recognition signals in species of *Bombus*. *Biochem. Syst. Ecol*., 40(2): 103-111.

Bertsch A, Schweer H, Titze A, 2008. Chemistry of the cephalic labial gland secretions of male *Bombus morrisoni* and *B. rufocinctus*, two North American bumblebee males with perching behavior. *J. Chem. Ecol*., 34(10): 1268-1274.

Bertsch A, Schweer H, Titze A, Tanaka H, 2005. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *B. magnus* (Hymenoptera, Apidae). *Insect. Soc*., 52(1): 45-54.

Brasero N, Martinet B, Urbanova K, Valterova I, Torres A, Hoffmann W, Rasmont P, Lecocq T, 2015. First chemical analysis and characterization of the male species-specific cephalic labial-gland secretions of South American bumblebees. *Chem. Biodivers*., 12(10): 1535-1546.

Cnaani J, Schmid-Hempel R, Schmidt JO, 2002. Colony development, larval development and worker reproduction in *Bombus impatiens* Cresson. *Insect. Soc*., 49(2): 164-170.

Coppée A, Mathy T, Cammaerts MC, Verheggen FJ, Terzo M, Iserbyt S, Valterová I, Rasmont P, 2011. Age-dependent attractivity of males' sexual pheromones in *Bombus terrestris* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Chemoecology*, 21(2): 75-82.

Dafni A, 1998. The threat of *Bombus terrestris* spread. *Bee World*, 79(3): 113-114.

De Meulemeester T, Gerbaux P, Boulvin M, Coppée A, Rasmont P, 2011. A simplified protocol for bumble bee species identification by cephalic secretion analysis. *Insect. Soc*., 58(2): 227-236.

Dohzono I, Kunitake YK, Yokoyama J, Goka K, 2008. Alien bumble bee affects native plant reproduction through interactions with native bumble bees. *Ecology*, 89(11): 3082-3092.

Goulson D, Hanley ME, 2004. Distribution and forage use of exotic

bumblebees in South Island. *N. Z. J. Ecol.*, 28(2): 225 - 232.

Hines HM, Williams PH, 2012. Mimetic colour pattern evolution in the highly polymorphic *Bombus trifasciatus* (Hymenoptera: Apidae) species complex and its comimics. *Zool. J. Linn. Soc.*, 166(4): 805 - 826.

Hingston AB, 2005. Does the introduced bumblebee, *Bombus terrestris* (Apidae), prefer flowers of introduced or native plants in Australia? *Aust. J. Zool.*, 53: 29 - 34.

Hingston AB, 2006. Is the exotic bumblebee *Bombus terrestris* really invading Tasmanian native vegetation? *J. Insect Conserv.*, 10(3): 289 - 293.

Inoue MN, Yokoyama J, Washitani I, 2008. Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris*, (L.) (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Conserv.*, 12(2): 135 - 146.

Ishii HS, Kadoya T, Kikuchi R, Suda SI, Washitani I, 2008. Habitat and flower resource partitioning by an exotic and three native bumble bees in central Hokkaido, Japan. *Biol. Conserv.*, 141(10): 2597 - 2607.

Kanbe Y, Okada I, Yoneda M, Goka K, Tsuchida K, 2008. Interspecific mating of the introduced bumblebee *Bombus terrestris* and the native Japanese bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis* results in inviable hybrids. *Naturwissenschaften*, 95(10): 1003 - 1008.

Kondo NI, Yamanaka D, Kanbe Y, Kunitake YK, Yoneda M, Tsuchida K, Goka K, 2009. Reproductive disturbance of Japanese bumblebees by the introduced European bumblebee *Bombus terrestris*. *Naturwissenschaften*, 96(4): 467 - 475.

Lecocq T, Coppée A, Mathy T, Lhomme P, Cammaerts T, Marie C, Urbanová K, Valterová I, Rasmont P, 2015a. Subspecific differentiation in male reproductive traits and virgin queen preferences, in *Bombus terrestris*. *Apidologie*, 46(5): 595 - 605.

Lecocq T, Dellicour S, Michez D, Dehon M, Dewulf A, De MT, Brasero N, Valterová I, Rasplus JY, Rasmont P, 2015b. Methods for species delimitation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*): towards an integrative approach. *Zool. Scr.*, 44(3): 281 - 297.

MacFarlane RP, Patten KD, Mayer DF, Shanks CH, 1994. Evaluation of commercial bumblebee colonies for cranberry pollination. *Melanderia*, 50: 13 - 19.

Mah YI, Lee MY, Bilinski M, 2001. Some characteristics of Korean indigenous bumblebee species (Hymenoptera; *Bombus* spp.) under laboratory conditions. *Acta Hortic.*, 561: 287 - 291.

O'Neill KM, Evans HE, Bjostad LB, 1991. Territorial behaviour in males of three North American species of bumblebees (Hymenoptera: Apidae, *Bombus*). *Can. J. Zool.*, 69(3): 604 - 613.

Payne CM, Laverty TM, Lachance MA, 2003. The frequency of multiple paternity in bumble bee (*Bombus*) colonies based on microsatellite DNA at the B10 locus. *Insect. Soc.*, 50(4): 375 - 378.

Rasmont P, Terzo M, Aytekin AM, Hines H, Urbanova K, Cahlikova L, Valterova I, 2005. Cephalic secretions of the bumblebee subgenus *Sibiricobombus* Vogt suggest *Bombus niveatus* Kriechbaumer and *Bombus vorticosus* Gerstaecker are conspecific (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*, 36(4): 571 - 584.

Schmitt U, 1990. Hydrocarbons in tarsal glands of *Bombus terrestris*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 46(10): 1080 - 1082.

Sobotník J, Kalinová B, Cahlíková L, Weyda F, Ptacek V, Valterova I, 2008. Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*. *J. Insect Physiol.*, 54(1): 204 - 214.

Takahashi J, Itoh M, Shimizu I, Ono M, 2008. Male parentage and queen mating frequency in the bumblebee *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Bombinae). *Ecol. Res.*, 23(6): 937 - 942.

Terzo M, Valterová I, Rasmont P, 2007. Atypical secretions of the male cephalic labial glands in bumblebees: the case of *Bombus* (*Rhodobombus*) *mesomelas* Gerstaecker (Hymenoptera, Apidae). *Chem. Biodiver.*, 4(7): 1466 - 1471.

Terzo M, Urbanova K, Valterova I, Rasmont P, 2005. Intra and interspecific variability of the cephalic labial glands' secretions in male bumblebees: the case of *Bombus* (*Thoracobombus*) *ruderarius* and *B.* (*Thoracobombus*) *sylvarum* [Hymenoptera, Apidae]. *Apidologie*, 36(1): 85 - 96.

Velthuis HHW, van Doorn A, 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4): 421 - 451.

Williams PH, An J, Brown MJF, Carolan JC, Goulson D, Huang J, Ito M, 2012. Cryptic bumblebee species: consequences for conservation and the trade in greenhouse pollinators. *PLoS ONE*, 7(3): e32992.

Williams PH, Huang J, An J, 2017. Bear wasps of the Middle Kingdom: a decade of discovering China's bumble bees. *Antenna*, 41(1): 21 - 24.

Williams PH, Osborne JL, 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40(3): 367 - 387.

Yong SS, Park SD, Kim JH, 2007. Influence of pollination methods on fruit development and sugar contents of oriental melon (*Cucumis melo* L. cv. Sagyejeol-Ggul). *Sci. Horic.*, 112(4): 388 - 392.

Žáček P, Kalinová B, Šobotník J, Hovorka O, Ptáček V, Coppée A, Verheggen F, Valterová I, 2009. Comparison of age-dependent quantitative changes in the male labial gland secretion of *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum*. *J. Chem. Ecol.*, 35(6): 698 - 705.

Zhou ZY, Zhang H, Liang C, Zou Y, Dong J, Yuan XL, Huang JX, An JD, 2015. Foraging preference of the honeybee *Apis mellifera* and the bumblebee *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera: Apidae) in peach greenhouse. *Acta Entomol. Sin.*, 58(12): 1315 - 1321. [周志勇，张红，梁铖，邹宇，董捷，袁晓龙，黄家兴，安建东，2015. 西方蜜蜂和兰州熊蜂在设施桃园的访花偏好性比较. 昆虫学报，58(12): 1315 - 1321]

Zhou ZY, 2016. Comparison of Biological Characteristics of Four Chinese Bumblebee Species. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [周志勇，2016. 中国四种熊蜂的生物学特性比较. 北京：中国农业科学院硕士学位论文]

(责任编辑：赵利辉)